

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 C12N 5/08	(7) 優先権 A1	(11) 国際公開番号 WO98/21313 (43) 国際公開日 1998年5月22日 (22.05.98)
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/03797 (22) 国際出願日 1997年10月21日 (21.10.97) (30) 優先権データ 特願平8/296041 1996年11月8日 (08.11.96) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 大塚製薬株式会社 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP] 〒101 東京都千代田区神田司町2丁目9番地 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 十河真司 (SOGO, Shinji) [JP/JP] 〒770 徳島県徳島市中昭和町2丁目39番地の1 ローレルハイツ中村205号 Tokushima, (JP) 山西一也 (YAMANISHI, Kazuya) [JP/JP] 〒770 徳島県徳島市大原町東千代ケ丸19-139 Tokushima, (JP) 足立正一 (ADACHI, Masakazu) [JP/JP] 〒370 群馬県高崎市石原町3493-9 Gunma, (JP) 池原 進 (IKEHARA, Susumu) [JP/JP] 〒534 大阪府大阪市都島区友渚町1丁目5-8-1004 Osaka, (JP)		(74) 代理人 弁理士 三枝英二, 外 (SAEGUSA, Eiji et al.) 〒541 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜TNKビル Osaka, (JP) (81) 指定国 CA, NZ, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する陳述
(54) Title: METHOD FOR CULTURING HEMATOPOIETIC STEM CELLS (54) 発明の名称 造血幹細胞の培養方法 (57) Abstract A novel liquid culture technique for hematopoietic stem cells for which no effective culture technique has hitherto been established. A method for culturing hematopoietic stem cells, characterized by subjecting human hematopoietic stem cells, with the phenotype thereof being characterized as CD34 ⁺ and c-kit, to liquid culturing in the presence of a hematopoietic stem cell growth factor in an adhesive incubator; and hematopoietic stem cells which are useful for clinical applications and studies and are propagated and harvested by the above method.		

(57) 要約

本発明は、従来効果的な培養技術が確立されていなかった造血幹細胞に対する新しい液体培養技術を提供することを目的とする。本発明は、造血幹細胞増殖因子の存在下に、表現型がCD34⁺及びc-kit⁻として特徴づけられるヒト造血幹細胞を、付着性培養器により液体培養することを特徴とする造血幹細胞の培養方法、及び該方法によって増殖取得される臨床並びに研究において有用な造血幹細胞である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード (参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SN	セネガル
AM	アルメニア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
AT	オーストリア	GB	英国	LV	ラトヴィア	TD	チャド
AU	オーストラリア	GE	グルジア	MC	モナコ	TC	トーゴ
AZ	アゼルバイジャン	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GM	ガambia	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BB	バルバドス	GN	ギニア	MK	マケドニア共和国	TR	トルコ
BE	ベルギー	GW	ギニア・ビサウ		マリ	TT	トリニダード・トバゴ
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	ML	マリ	UA	ウクライナ
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
BR	ブラジル	ID	インドネシア	MR	モリタニア	US	米国
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CA	カナダ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	VN	ベトナム
CC	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CG	コンゴ共和国	IT	イタリア	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CH	スイス	JP	日本	NO	ノルウェー		
CI	コートジボワール	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
CM	カメルーン	KG	キルギス	PL	ポーランド		
CN	中国	KR	韓国	PT	ポルトガル		
CU	キューバ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア		
CY	キプロス	LC	セント・ルシア	SE	スウェーデン		
CZ	チェコ	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		
DE	ドイツ	LK	スリランカ	SI	スロベニア		
DK	デンマーク	LR	リベリア	SK	スロバキア		
EE	エストニア	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ		

明 細 書

造血幹細胞の培養方法

技 術 分 野

- 5 本発明は、ヒト造血幹細胞の新しい培養方法に関する。

背 景 技 術

- 造血幹細胞とは、自己複製能及び全ての成熟血球に分化する能力を持った細胞と定義される。その大部分は、
10 造血支持能を有する骨髓ストローマ細胞に接着した態様で、骨髓に存在しているものと考えられる。そして僅かではあるが、造血幹細胞は定常状態において末梢血中にも存在しており、化学療法後の骨髓回復期や造血刺激因子 C S F (colony-stimulating factor) の投与後には、
15 末梢血中の造血幹細胞が著増することが知られている。

また、造血幹細胞は臍帯血中にも存在しており、この臍帯血幹細胞は、骨髓に存在する造血幹細胞に比して高いコロニー形成能を有することが知られている。

- 近年、このような造血幹細胞を、抗体によって同定さ
20 れる特異的なエピトープ部位と関連するマーカー〔例えば、C D 3 3、C D 3 8、C D 1 1 7 (c-kit)、H L A - D R 等のマーカー〕の存在の有無を指標として、特定

しようと試みられている。かかる方法によって、現在、ヒトの造血幹細胞に関しては、表現型として $CD34^+CD33^-$ 、 $CD34^+CD38^-$ と示される分画等が、造血幹細胞に該当するのではないかと考えられている。

5 また最近、stem cell factor (SCF) のレセプターである $CD117$ (c-kit) をメルクマールとする特定法を用いた、羊に対する *in vivo* 実験において、 $CD34^+c-kit^{low}$ 細胞が、移植可能な造血幹細胞であると報告されている。

10 一方、骨髓ストローマ細胞を用いた *in vitro* 長期培養系において、 $CD34^+c-kit^{low}$ 細胞よりも $CD34^+c-kit^-$ 細胞の方が、より長期に培養可能であるとの報告もあり、その結論が待たれる所である。

15 近年、白血病等の疾患に対して、骨髓移植が活発に行なわれている。しかしながら、骨髓移植はドナーに対する負担が大きい等の種々の短所があり、これに対して、末梢血幹細胞または臍帯血幹細胞の移植は、次に述べるような利点がある。

20 即ち、末梢血幹細胞の移植は、(i)アフレーシスによって自己幹細胞を採取するため、骨髓移植の場合のような麻酔をする必要がなく、全身状態や臓器機能の悪い患者においても施術可能であること、(ii)また、移植術後

の造血回復速度も速く、H L A が一致する正常ドナーからの血小板採取回数も低減でき、患者と移植チームに対する負担が大幅に軽減すること等の利点を有する。

また、臍帯血幹細胞の移植は、(i)該細胞が通常廃棄される臍帯から採取されるものであるため、ドナー(donor)への負担が全くないこと、(ii)また、新生児血液であることから採取時にウイルス等の感染の危険性もほとんどなく、移植後の G V H D (graft-versus-host disease) も起こりにくいこと等の利点がある。

10 このように、末梢血幹細胞移植及び臍帯血幹細胞移植は、白血病等の腫瘍性疾患並びに重症再生不良性貧血等の非腫瘍性疾患に対する根治療法として、重要な位置を占めるようになってきている。

かかる造血幹細胞移植の臨床展開と並行して、造血幹細胞の *ex vivo* 増殖法の開発の重要性が指摘されており
15 (小澤敬也：臨床科学 30巻3号、p 315~320 (1994))、活発な研究が行なわれている。しかしながら、現在でもなお、造血幹細胞を、液体培養によって、その自己複製能及び全成熟血球への分化能を維持したままで増殖させる技術は、開発されるに至っていない。
20

僅かにストローマ細胞を用いた系が知られてはいるが、これは以下の如き欠点があり、実用面からは適さないと

考えられる。

即ち、第 1 に造血幹細胞にはストローマ細胞に接着する性質があるため、ストローマ細胞と分離して造血幹細胞を回収することが困難であること、第 2 にストローマ細胞は正と負の両方の増殖調節因子を産生することにより巧妙に造血を制御しているため、造血幹細胞の自己複製刺激作用を選択的に強化することは、細胞レベルでは困難であること等が挙げられる。

また、造血幹細胞の培養技術は、上述した幹細胞移植術の面からのみならず、遺伝子治療の面からもその確立が急務とされている。

事実、遺伝子治療は、現在効果的な治療法のない致死的な遺伝性疾患、ある種の悪性腫瘍、及びエイズのように既存の治療法の成績が極めて悪い疾患に対して、治療効果が期待できること、他の疾患についても既存の治療法より優れた治療法となること等から、新しい治療法として急速に広がりを見せている。

かかる遺伝子治療のための標的細胞として造血幹細胞が選択され、該細胞に遺伝子が導入された場合には、造血幹細胞本来の自己複製能によって遺伝子の発現が永続し、遺伝子による効果も持続するだろうと期待される。このため、遺伝子導入操作を行なう原料となる造血幹細胞

胞を大量に得るべく、*ex vivo*増殖法の確立が斯界で望まれている。

本発明は、従来、効果的な培養技術が確立されていなかった造血幹細胞の*ex vivo*増殖法の提供、具体的には、
5 移植及び遺伝子療法において有用な造血幹細胞を有意に増殖産生できる新しい液体培養技術を提供することを目的とするものである。

発 明 の 開 示

10 本発明者らは、造血幹細胞として表現型がCD34⁺及びc-kit⁻として特徴づけられる細胞を選択し、これを造血幹細胞増殖因子の存在下で付着性培養器を用いて液体培養することによって得られる培養細胞が、あらゆる成熟血球に分化する能力を保持していることを見出し、
15 れにより、上記目的に合致する造血幹細胞の培養方法が確立できることを確認して、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、造血幹細胞増殖因子の存在下に、表現型がCD34⁺及びc-kit⁻として特徴づけられるヒト造血幹細胞を、付着性培養器を用いて液体培養すること
20 を特徴とする造血幹細胞の培養方法である。

また、本発明は、かかる培養方法によって増殖取得される造血幹細胞、特に表現型がCD34⁺及びc-kit⁺とし

て特徴づけられる造血幹細胞である。

図面の簡単な説明

図 1 は、ヒト臍帯血から、C D 3 4 マルチソーティングキットを用いた免疫ビーズ法において陽性選択 (positive selection) して得られた、C D 3 4⁺細胞分画を、F I T C 標識抗 C D 3 4 クラス III 抗体及び P E 標識抗 c-kit 抗体により二重染色したパターン (図 1 中、C)、アイソタイプ適合コントロールである F I T C 標識マウス I g G 1 及び P E 標識マウス I g G 1 で二重染色したパターン (図 1 中、B)、及び前方散乱 (F S C) 及び側方散乱 (S S C) のパターン (図 1 中、A) を示す図である (実施例 1 参照)。

図 2 において、B は、実施例 1 において、F A C S t a r でソーティングした C D 3 4⁺c-kit⁻細胞 (R 2)、C D 3 4⁺c-kit^{low}細胞 (R 3) 及び C D 3 4⁺c-kit^{high}細胞 (R 4) を培地のみに懸濁させ、細胞付着性プレート上で 24 時間培養した後、F I T C 標識抗 C D 3 4 クラス III 抗体及び P E 標識抗 c-kit 抗体で染色し、F A C S c a n を用いて培養後の細胞における C D 3 4 及び c-kit 分子の発現状態を調べた結果を示す図である。A は、F A C S t a r でのソーティング後培養前の各細胞の C

D 3 4 と c-kit の発現パターンを示す。

図 3 は、実施例 1 において、C D 3 4 ⁺c-kit⁻細胞を、各添加物の存在下で培養して、培養後の細胞における c-kit 分子の発現状態を調べた結果を示す図である。図 3 中 (A) は無添加対照、(B) は F L 添加、(C) は I L - 6 添加、(D) は固相化抗 C D 3 4 抗体を用いた C D 3 4 分子の架橋 (C D 3 4 x L : CD34 cross-linking)、(E) は F L + I L - 6 添加、(F) は F L + I L - 6 + I L - 7 添加、(G) は F L + I L - 6 + I L - 7 + C D 3 4 x L 添加の結果をそれぞれ示す。

図 4 は、実施例 1 において、細胞非付着性培養器中で C D 3 4 ⁺c-kit⁻細胞を培養した場合における c-kit 分子の発現状態を調べた結果を示す図である。図中 A は、C D 3 4 ⁺c-kit⁻細胞を浮遊細胞培養用プレート中で培地のみを用いて培養した結果を、B は同プレート中で F L 存在下で培養した結果を示す。図中 C は C D 3 4 ⁺c-kit⁻細胞をプロピレン製チューブ中で F L 存在下で培養した結果を示す。

20 発明の実施するための最良の形態

本発明においては、起源細胞として、表現型が C D 3 4 ⁺及び c-kit⁻として特徴づけられるヒト造血幹細胞を用

いることを必須とする。

かかる起源細胞は、常法に従って、各種造血幹細胞より調製、単離（純化）することができる。原料とする造血幹細胞は、末梢血幹細胞、骨髓幹細胞及び臍帯血幹細胞のいずれでもよい。またその調製、単離（純化）は、
5 目的とする造血幹細胞のマーカーを指標として通常の方法により行なうことができる。その詳細については、後述する実施例に例示される。

本発明において、造血幹細胞の培養及び増殖に用いられる造血幹細胞増殖因子としては、特に制限されることなく、従来からよく知られている各種のコロニー刺激因子（colony-stimulating factor：C S F）等が挙げられる。これらは、通常と同様な方法で利用することができる。その具体例としては、例えば各種のサイトカイン類
15 [f l t - 3 リガンド（flt-3 ligand：F L）、インターロイキン-6（interleukin-6：I L - 6）等]、幹細胞因子（stem cell factor：S C F）に対して相乗作用を示すインターロイキン-7（interleukin-7：I L - 7）、C D 3 4 分子の架橋（以下、C D 3 4 x L という）等を
20 例示することができる。

なお、「C D 3 4 x L」とは、C D 3 4 陽性細胞に対してその表面上に発現しているC D 3 4 分子を架橋する

ことにより刺激を加えることを意味する。また、この「C D 3 4 x L」を行うためには、限定はされないが、通常、固相化した抗 C D 3 4 抗体が用いられる。

5 付着性培養器としては、浮遊性細胞培養用の処理がしてあるものや細胞付着性が著しく低くなるような処理または材質のものでない限り、特に制限されないが、好適にはポリスチレン製の培養器が挙げられる。より好適には、付着性細胞の培養を容易にするべく細胞接着性を増強させる処理が表面に施された容器である。

10 液体培養の条件は、特に限定されることなく一般に用いられる各種の条件をいずれも採用することができる。

液体培養に用いられる培地としては、代表的には、造血幹細胞を培養するためによく使用されている培養液、例えば α -M E M (α -Minimum Essential Medium)、イスコフ改変ダルベッコ培地 (I M D M) 等の適当な培地
15 を基本培地として、これに、非働化胎児ウシ血清 (F B S) 及び非働化ウマ血清 (horse serum) をそれぞれ 1 0 % 程度加えたもの、更に細胞の維持及び増殖を促す添加物として、例えば f l t - 3 リガンド (flt-3 ligand)
20 1 0 0 ng/ml、インターロイキン-6 1 0 ng/ml、インターロイキン-7 1 0 ng/ml、または固相化した抗 C D 3 4 抗体 (1 0 μ g / m l の濃度でプレートに固相化し

たもの)を、それぞれ単独で或いは組み合わせて添加したものが挙げられる。

培養条件は、通常のヒト細胞の培養と同様でよく、一般には、37℃、5%CO₂下で行なうことができる。

- 5 本発明の培養方法によって、得られる培養細胞は、いずれもCD34陽性(CD34⁺)を示し、CD117(以下、c-kitという)分子の発現程度が陰性から高い陽性(high)まで認められるという特徴を有する。これらの細胞のうち、c-kit分子の発現程度が低い陽性(low)
- 10 の細胞(c-kit^{low}細胞)及び高い陽性(high)の細胞(c-kit^{high}細胞)に関しては、さらにEpo、IL-3、GM-CSF、G-CSF、SCF等の存在下で、赤血球系コロニー、顆粒球/マクロファージ系コロニー、マクロファージ系コロニー、顆粒球/赤血球系/巨核球/マク
- 15 ロファージ系コロニーを形成する能力を有するという特徴を有する。

実施例

- 以下、本発明を更に詳しく説明するため実施例を挙げ
- 20 るが、本発明は、これらの実施例によってなんら限定されるものではない。

実施例 1

1. 造血幹細胞 (CD34⁺c-kit⁻) の分離

(1) 材料及び方法

- インフォームドコンセントが行なわれた健常人ボランティアからの臍帯血を、ACD-A液 (クエン酸ナトリウム 2.20 w/v%、クエン酸 0.80 w/v%、ブドウ糖 2.20 w/v%、pH 4.5 ~ 5.5 : Terumo, Shibuya Tokyo, Japan) が 6 ml 入った 50 ml 容量チューブに採取した。これに 2% デキストラン溶液 [Dextran
- 10 T-500 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) を 2% (w/v) の濃度で生理食塩水に溶解したもの] を、ACD-A液に対して容積比 2 : 1 となる割合で添加し、攪拌後、30 分間静置し、上清を臍帯血有核血球 (Cord Blood Nuclear Cells : CBNC) 分画として回収した。
- 15 この分画を Lymphoprep (Nycomed, Oslo, Norway) に重層し、2000 rpm で 30 分間遠心することにより臍帯血単核球画分 (Cord Blood Mononuclear Cells : CBMNC) を得た。

- 更に、CD34 マルチソーティングキット (CD34 multisort
- 20 kit : Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) 及びミニマックス (MiniMACS : Miltenyi Biotec, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用い

て C D 3 4 + 細胞を単離した。

- この C D 3 4 + 細胞を F I T C (fluorescein isothiocyanate) 標識抗 C D 3 4 クラス III 抗体 (HPCA2 :Cat. No. 348053, Becton Dickenson Immunocytometry Systms, San Jose, CA, USA) 及び P E (Phycoerythrin) 標識抗 c-kit 抗体 (Cat. No. 1360, Immunotech, Merseile, France) を用いて二重染色し、次いで F A C S t a r (Becton Dickenson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA) を用いてソーティングした。
- 10 また、アイソタイプ適合コントロールとして F I T C 標識マウス I g G 1 (Cat. No. 9041, Becton Dickenson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA) 及び P E 標識マウス I g G 1 (Cat. No. 9043, Becton Dickenson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA) を用いた。
- 15

- これらの単離細胞のコロニー形成能を調べるために、上記単離細胞を完全メチルセルロース培地 (Methocult GF H4434V, Stemcell technologies Inc., Vancouver, BC, Canada) に懸濁して、その 0. 8 m l づつを 1 2 ウェルプレート (Cat. No. 76-063-05, Flow Laboratories Inc., McLean, USA) に播種して、37℃、5% CO₂ の条件で CO₂ インキュベーター (Tabai, Japan) 中にて培
- 20

養を行なった。14日後に倒立顕微鏡下においてコロニーを判別及び計測し、B F U - E (Burst-forming unit-erythroid)、C F U - G M (Colony-forming unit-granulocyte/macrophage)、C F U - M (Colony-forming unit-macrophage) 及び C F U - G E M M (Colony-forming unit-granulocyte/erythroid/megakaryocyte/macrophage) 数を算出した。

各実験は4回行ない、結果は平均 (Mean) \pm 標準誤差 (S E) として求めた。

10 (2) 結果

結果を図1に示す。

図1中Aは、ヒト臍帯血から、C D 3 4 マルチソーキットを用いた免疫ビーズ法において陽性選択して得られた、C D 3 4 ⁺細胞分画のF S C (前方散乱) - S S C (側方散乱) パターンを示す。これから、blast gate (R 1) をかけた集団のF I T C - P E パターンを図1のB及びCに示す。具体的には、図1中Cは、F I T C 標識抗C D 3 4 クラスIII抗体及びP E 標識抗c-kit抗体で二重染色した結果を示し、またBはアイソタイプ適合コントロールであるF I T C 標識マウスI g G 1 及びP E 標識マウスI g G 1 で二重染色した結果を示す。また、図1のC中、R 2、R 3 及びR 4 はそれぞれC D 3 4 ⁺

c-kit⁻、CD34⁺c-kit^{low}及びCD34⁺c-kit^{high}をソーティングするためのゲートである。

CD34陽性細胞（CD34⁺細胞）のうち、PE標識マウスIgG1を用いたネガティブ細胞の蛍光強度より
5 も十分に低い蛍光強度を示す画分を「c-kit陰性画分」（CD34⁺c-kit⁻分画）とし、ネガティブ細胞の蛍光強度より少し強い画分を「c-kit弱陽性」（CD34⁺c-kit^{low}分画）とし、またc-kitが最も強い発現量を示す画分を「c-kit強陽性画分」（CD34⁺c-kit^{high}分画）
10 として、それぞれゲート設定した。

上記で設定したFACSstarを用いて、上記で設定したそれぞれの細胞をソーティングし、分けられた分画を同様に設定されたFACSscan（Becton Dickinson Immunocytometry Systems: SanJose, CA, USA）を用いて
15 再解析した結果、CD34⁺c-kit⁻分画、CD34⁺c-kit^{low}分画及びCD34⁺c-kit^{high}分画において、設定通りの細胞が得られていることが確認された。

次に、これらの各分画の細胞のコロニー形成能を調べるために、メチルセルロース培地を用いてコロニー形成
20 分析を行った。結果を表1に示す。

< 表 1 >

5

細 胞	コロニー数/50細胞		
	BFU-E	CFU-GM+CFU-M	CFU-GEMM
CD34 ⁺ c-kit ⁻	3.5 ± 1.1	14.0 ± 1.5	0.0 ± 0.0
CD34 ⁺ c-kit ^{low}	10.1 ± 2.0	21.5 ± 1.0	0.7 ± 0.2
CD34 ⁺ c-kit ^{high}	12.0 ± 1.0	34.6 ± 2.5	1.1 ± 0.2

10

表1より、c-kit抗原の発現が高い分画ほどコロニー形成能も高いことが示された。一方、c-kit抗原の発現が陰性である分画、つまりCD34⁺c-kit⁻分画はコロニー形成能を殆ど有しないことが示された。

2. 造血幹細胞の培養

(1) 材料と方法

20 得られたCD34⁺c-kit⁻分画、CD34⁺c-kit^{low}分画及びCD34⁺c-kit^{high}分画をそれぞれ、10%熱非働化FBS(Stemcell Technology Inc., Vancouver, BC,

Canada) 及び 10 % 熱非働化ウマ血清 (H o S : Stem cell Technology Inc., Vancouver, BC, Canada) を含む α -M E M (Gibco, Grand Island, NY, USA) に懸濁し、細胞付着性の 24 ウェルプレート (Cat. No. 76-063-05, 5 Flow Laboratories Inc., McLean, USA) に播種した。

また、同様に、各分画の細胞をそれぞれ、細胞非付着性の 24 ウェルプレート (浮遊培養用マルチプレート ; Cat. No. MS-8024R, Sumitomo Bankelite Co., Ltd., Tokyo, Japan) またはスクリーキャップ付きポリプロピレン 10 製 1. 7 m l チューブ (GENE twist top vial ; Cat. No. 1441, Yashima Purechemicals Co., Ltd., Osaka, Japan) にも播種した。

これらのプレート及びチューブをそれぞれ 37 °C、5 % C O₂ の条件下で、C O₂ インキュベーター (Tabai, 15 Japan) 中にて培養した。

培養液中に添加する造血幹細胞増殖因子として、組換えヒト F L (recombinant human flt-3 ligand, rhFL : Cat. No. 80-3692-01, Genzyme, Cambridge, MA, USA)、組換えヒト I L - 6 (recombinant human IL-6, rhIL-6 : 20 Cat. No. 1131567, Boehringer Mannheim Biomedica, Germany) または組換えヒト I L - 7 (recombinant human IL-7, rhIL-7 : Cat. No. F1-1587-1, Genzyme,

Cambridge, MA, USA) 等のサイトカインを用いた。

抗CD34クラスIII抗体 (Cat. No. 550018, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA) を $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度となるようにPBS(-)で
5 希釈し、24ウェルプレートに $300 \mu\text{l}$ ずつ添加した。

37℃で60分間インキュベートし、抗体溶液を除いた後、 α -MEM (10% FBS + 10% HOSを含有) を添加して、37℃で30分間ブロッキングした。

次いで、PBS (0.1% FBS含有) で各ウェルを
10 3回洗浄して抗CD34抗体を固相化した培養用プレートを調製し、得られた抗CD34抗体固相化プレート上でCD34陽性細胞を培養することによって、CD34陽性細胞に対してCD34 x Lを行なった。

細胞は、液体培養後ピペッティング操作により24ウェルプレートより回収し、一部を完全メチルセルロース
15 培地 (Methocult GF H4434V, Stemcell technologies Inc., Vancouver, BC, Canada) に懸濁して、0.8 ml ずつを12ウェルプレート (Cat. No. 76-063-05, Flow Laboratories Inc., McLean, USA) に播種して37℃、
20 5% CO₂の条件で、CO₂インキュベーター (Tabai, Japan) 中にて培養を行なった。14日後に倒立顕微鏡下においてコロニーを判別及び計測して、BFU-E、CF

U-GM、CFU-M及びCFU-GEMM数を算出した。

各実験は4回行ない、結果を平均 (Mean) \pm 標準誤差 (SE) で表した。

また残りの細胞は、FITC標識抗CD34クラスIII
5 抗体及びPE標識抗c-kit抗体で染色し、CD34抗原及びc-kit抗原の発現量をFACSscanで測定し、平均蛍光強度 (Mean fluorescence intensity) を検出器のチャンネルで表わした。

(2) 結果

10 単離したCD34⁺c-kit⁻細胞分画(R2)、CD34⁺c-kit^{low}細胞分画(R3)及びCD34⁺c-kit^{high}細胞分画(R4)を、 α -MEM (10% FBS + 10% HOS含有) に懸濁して、細胞付着性24ウェルプレートにて24時間培養した。培養前及び24時間培養後の各
15 分画R2、R3及びR4の細胞を、それぞれFITC標識抗CD34クラスIII抗体及びPE標識抗c-kit抗体を用いて染色し、FACSscanを用いてCD34⁺細胞におけるc-kit抗原分子の発現状態を調べた。

その結果を図2に示す。

20 図2は、ソーティング後の各分画(R2、R3及びR4)の培養前の発現パターン(図2中、A)、及び24時間培養後の各分画(R2、R3及びR4)の発現パタ

ーン（図 2 中、B）を示す。

図 2 からわかるように、全ての分画において、培養前（A）のc-kitの発現に比べて、24時間培養後（B）のc-kitの発現が増強していた。CD34⁺c-kit⁻分画（R2）においてもc-kit分子の発現が認められたが、24時間後に回収される細胞数は少なかった。

この分画（R2）の細胞の回収率を向上させるため、造血幹細胞増殖因子として、FL、IL-6といったサイトカイン、固相化抗CD34抗体を用いたCD34 x L、並びにSCF（stem cell factor）に対して相乗作用を示すIL-7を、それぞれ単独又は組み合わせて、培地に添加して培養を行なった。

即ち、CD34⁺c-kit⁻細胞を7000個ずつ、それぞれ24ウェルプレートに播種し、上記各添加物の所定量を添加（無添加を対照とする）して、3日間培養し、培養細胞をピペッティングにより回収して細胞数を計測した。

その後、細胞をFITC標識抗CD34クラスIII抗体及びPE標識抗c-kit抗体を用いて染色して、FACS scanを用いてCD34⁺細胞におけるc-kit分子の発現状態を調べた。

その結果を図3に示す。

図3において、(A)は無添加対照(培地のみ)の結果を、(B)はFL(100 ng/ml)添加の結果を、(C)はIL-6(10 ng/ml)添加の結果を、(D)は固相化抗CD34抗体を用いたCD34 x Lの結果を、(E)はFL(100 ng/ml) + IL-6(10 ng/ml)添加の結果を、(F)はFL(100 ng/ml) + IL-6(10 ng/ml) + IL-7(10 ng/ml)添加の結果を、(G)はFL(100 ng/ml) + IL-6(10 ng/ml) + IL-7(10 ng/ml) + CD34 x L添加の結果をそれぞれ示す。

10 回収された細胞数を計測した結果を下記表2に示す。

< 表 2 >

群	回収細胞数
(A) 群(無添加対照)	500
(B) 群(FL単独)	3000
(C) 群(IL-6単独)	2500
(D) 群(CD34XL単独)	1500
(E) 群(FL+IL-6)	3000
(F) 群(FL+IL-6+IL-7)	6000
(G) 群(FL+IL-6+IL-7+CD34XL)	5500

図3及び表2より、細胞付着性プレート上での培養において、FL、IL-6の添加及びCD34⁺IL-3はいずれもc-kit分子を発現させ、且つ造血幹細胞の回収率を向上させることが明らかである。特に、FLは、培養液に
5 添加することによって、CD34⁺c-kit⁻細胞に対して単独で最も細胞回収率及び発現強度を高めるサイトカインであることが示された。また、これを併用することにより、細胞の回収率は一層向上し、特にFL+IL-6+IL-7培養系及びFL+IL-6+IL-7+CD34⁺IL-3培養系では、添加した細胞とほぼ同程度の細胞を回収できた。

次に、上記FL+IL-6+IL-7+CD34⁺IL-3培養系におけるc-kit分子発現のカイネティックスをとった結果、培養後1～3日の時点において、c-kit分子の発現
15 は急激に上昇し、8日目にピークに達することが明らかとなった。一方、この培養系では、培養3日目でCD34⁺c-kit⁻の細胞集団が出現し、これは更に分化の進んだ細胞であると考えられた。

更に、CD34⁺c-kit⁻細胞の培養により誘導された上記CD34⁺c-kit⁺細胞がどのようなコロニー形成能を有しているかを調べるために、CD34⁺c-kit⁻細胞を細胞付着性プレート上で、FL+IL-6+IL-7+CD3
20

4 x L で刺激しながら培養した。48 時間後に培養細胞を回収して、F I T C 標識抗 C D 3 4 クラス III 抗体及び P E 標識抗 c-kit 抗体を用いて染色して、F A C S t a r を用いて、図 1 の C で示した R 3 (C D 3 4 ⁺c-kit^{low}) 及び R 4 (C D 3 4 ⁺c-kit^{high}) の各細胞の分画をソーティングし、その細胞のコロニー形成能をコロニーフォーミングアッセイによって調べた。

この結果を、誘導前の C D 3 4 ⁺c-kit⁻細胞のコロニー形成能及び同時にソーティングした C D 3 4 ⁺c-kit^{low}細胞と C D 3 4 ⁺c-kit^{high}細胞のそれぞれのコロニー形成能の結果と共に、次の表 3 に示す。

< 表 3 >

細胞	コロニー数/50細胞		
	BFU-E	CFU-GM+CFU-M	CFU-GEMM
5 CD34 ⁺ c-kit ⁻	3.3±1.1	6.3±1.3	0.0±0.0
CD34 ⁺ c-kit ^{low}	11.0±3.4	25.8±2.5	0.0±0.0
CD34 ⁺ c-kit ^{high}	19.0±2.0	25.3±1.3	0.5±0.3
10 CD34 ⁺ c-kit ⁻ → CD34 ⁺ c-kit ^{low}	6.3±2.3	25.5±2.5	0.0±0.0
CD34 ⁺ c-kit ⁻ → CD34 ⁺ c-kit ^{high}	12.3±1.4	28.0±1.9	0.3±0.3

15

表3から分かるように、CD34⁺c-kit⁻細胞を細胞付着性プレート上でFL+IL-6+IL-7+CD34xLで刺激、培養することによって誘導されたCD34⁺c-kit^{low}細胞及びCD34⁺c-kit^{high}細胞は、誘導前のCD34⁺c-kit⁻細胞に比べて、コロニー形成能が著しく増加し、最初に単離したCD34⁺c-kit^{low}細胞及びCD34⁺c-kit^{high}細胞（前記表1参照）と同程度のコロニ

20

一形成能を有することが明らかとなった。

最後に、CD34⁺c-kit⁻細胞からのc-kit分子の発現誘導が細胞付着性プレート以外の培養器においても起こり得るものであるか否かを調べるために、CD34⁺c-kit⁻細胞を細胞付着性の少ない浮遊細胞培養用プレート及び細胞がほとんど付着しないポリプロピレン製チューブにそれぞれ播種して、5%CO₂、37℃下に24時間培養を行なった。

その結果を図4に示す。

図4において、AはCD34⁺c-kit⁻細胞を α -MEM（10%FBS+10%HOS含有）のみに懸濁させて浮遊細胞培養用プレート中で培養した結果を、BはCD34⁺c-kit⁻細胞をFL（100ng/ml）を含む α -MEM（10%FBS+10%HOS含有）に懸濁させて浮遊細胞培養用プレート中で培養した結果を、またCはCD34⁺c-kit⁻細胞を α -MEM（10%FBS+10%HOS含有）のみに懸濁させてポリプロピレン製チューブで培養した結果をそれぞれ示す。

図4からわかるように、図2のB（R2）及び図3の（A）に比べて、細胞付着性の低い培養器ほど、c-kit分子の発現誘導が低下することが明らかとなった。特に、ポリプロピレン製チューブを用いた場合は、全くc-kit分子の

誘導は認められなかった。また、このc-kit分子の発現誘導の低下は、FLの添加によっても回復させることはできなかった。

5 これらのことより、CD34⁺c-kit⁻細胞を起源細胞として用いて、液体培養によって、FL + IL-6 + IL-7 + CD34 x Lで刺激、培養して、CD34⁺c-kit⁺細胞、すなわちCD34⁺c-kit^{low/high}細胞を得るためには、細胞付着性の培養器が必須であることが示された。

10

15

20

請求の範囲

1 造血幹細胞増殖因子の存在下に、表現型がCD3
4⁺及びc-kit⁻として特徴づけられるヒト造血幹細胞を、
5 付着性培養器を用いて液体培養することを特徴とする造
血幹細胞の培養方法。

2 造血幹細胞増殖因子が、コロニー刺激因子である
ことを特徴とする請求項1記載の造血幹細胞の培養方法。
10

3 造血幹細胞増殖因子が、flt-3リガンド(FL)、
インターロイキン-6、CD34xL及びインターロイ
キン-7からなる群から選択されるいずれか少なくとも
一種であることを特徴とする請求項1記載の造血幹細胞
15 の培養方法。

4 ヒト造血幹細胞が、臍帯血幹細胞または末梢血幹
細胞に由来するものであることを特徴とする請求項1乃
至3のいずれかに記載の造血幹細胞の培養方法。
20

5 付着性培養器が、ポリスチレン製の培養器である
ことを特徴とする請求項1乃至4のいずれかに記載の造

血幹細胞の培養方法。

6 付着性培養器が、その培養表面が細胞接着性を増強させる処理がなされたものであることを特徴とする請求項5記載の造血幹細胞の培養方法。

7 液体培養が、10%非働化FBS及び10%非働化ウマ血清を添加した α -MEMまたはイスコフ改変ダルベッコ培地で行われることを特徴とする請求項1乃至10のいずれかに記載の造血幹細胞の培養方法。

8 更に、flt-3リガンド100ng/ml、インターロイキン-6 10ng/ml、インターロイキン-7 10ng/ml及び固相化抗CD34抗体(10 μ g/mlの濃度で固相化)からなる群から選択される少なくとも一種を添加した α -MEMまたはイスコフ改変ダルベッコ培地で、液体培養が行われることを特徴とする請求項7記載の造血幹細胞の培養方法。

20 9 液体培養が、37℃、5%CO₂下で行われることを特徴とする請求項1乃至8のいずれかに記載の造血幹細胞の培養方法。

10 請求項1乃至9のいずれかに記載の培養方法により、増殖取得される造血幹細胞。

5 11 表現型がCD34⁺及びc-kit⁺として特徴づけられるものである、請求項10記載の造血幹細胞。

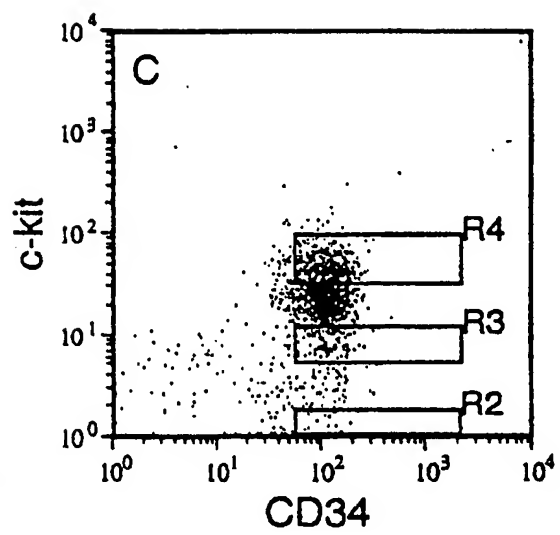
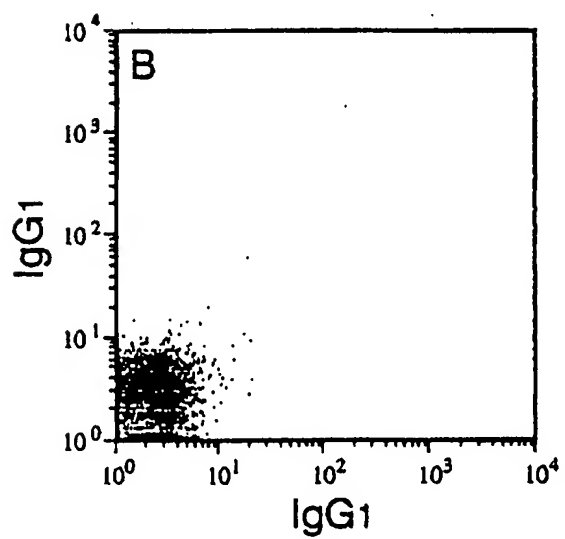
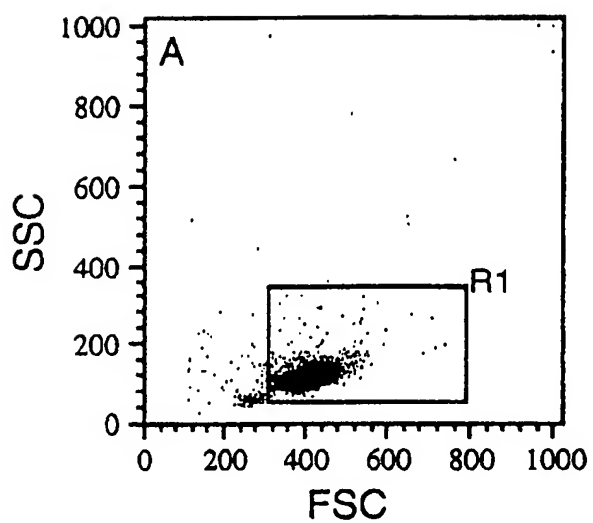
12 表現型がCD34⁺及びc-kit^{low}またはCD34⁺及びc-kit^{high}として特徴づけられるものである、請求項
10 11記載の造血幹細胞。

15

20

1 / 4

☒ 1



2 / 4

図 2

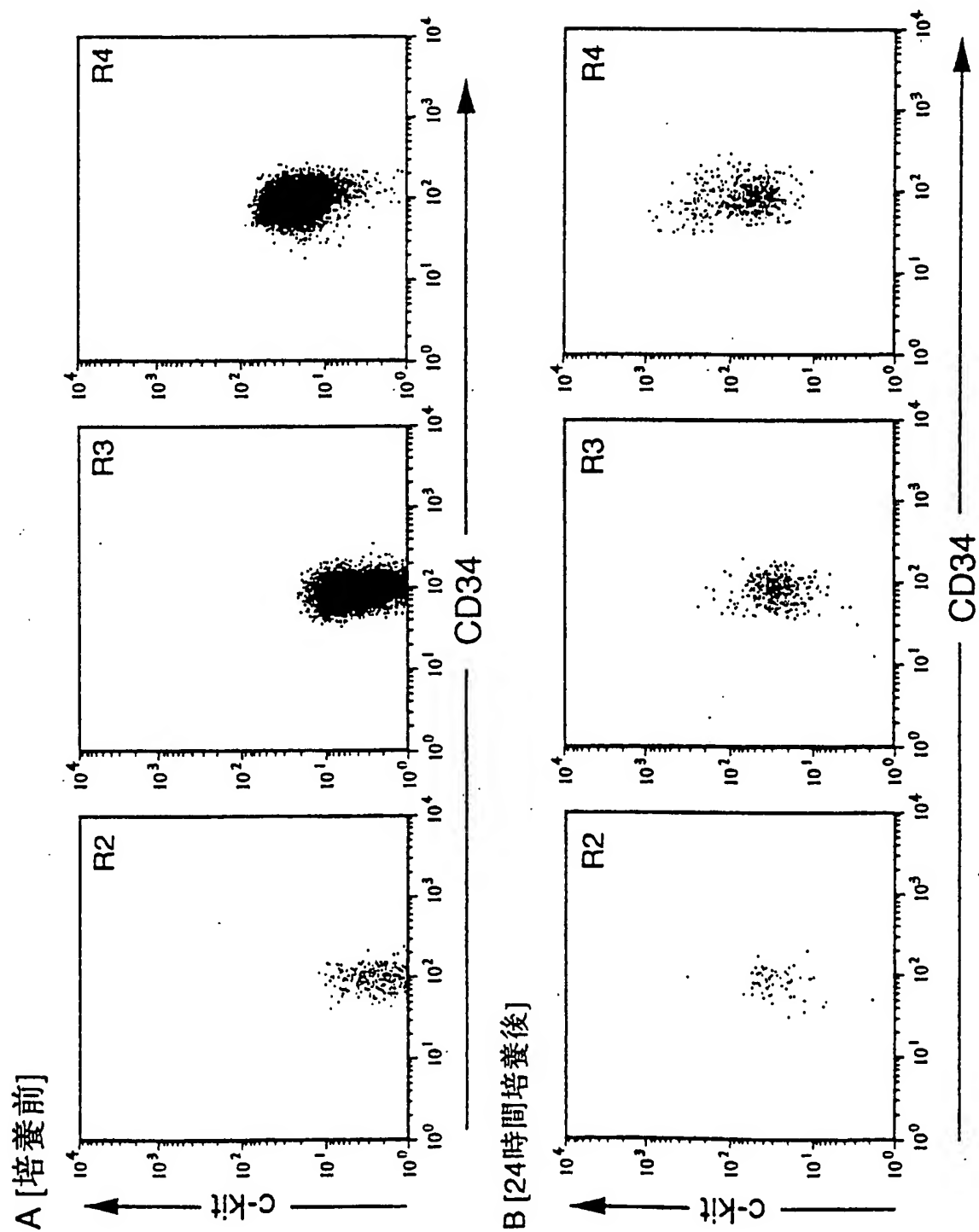
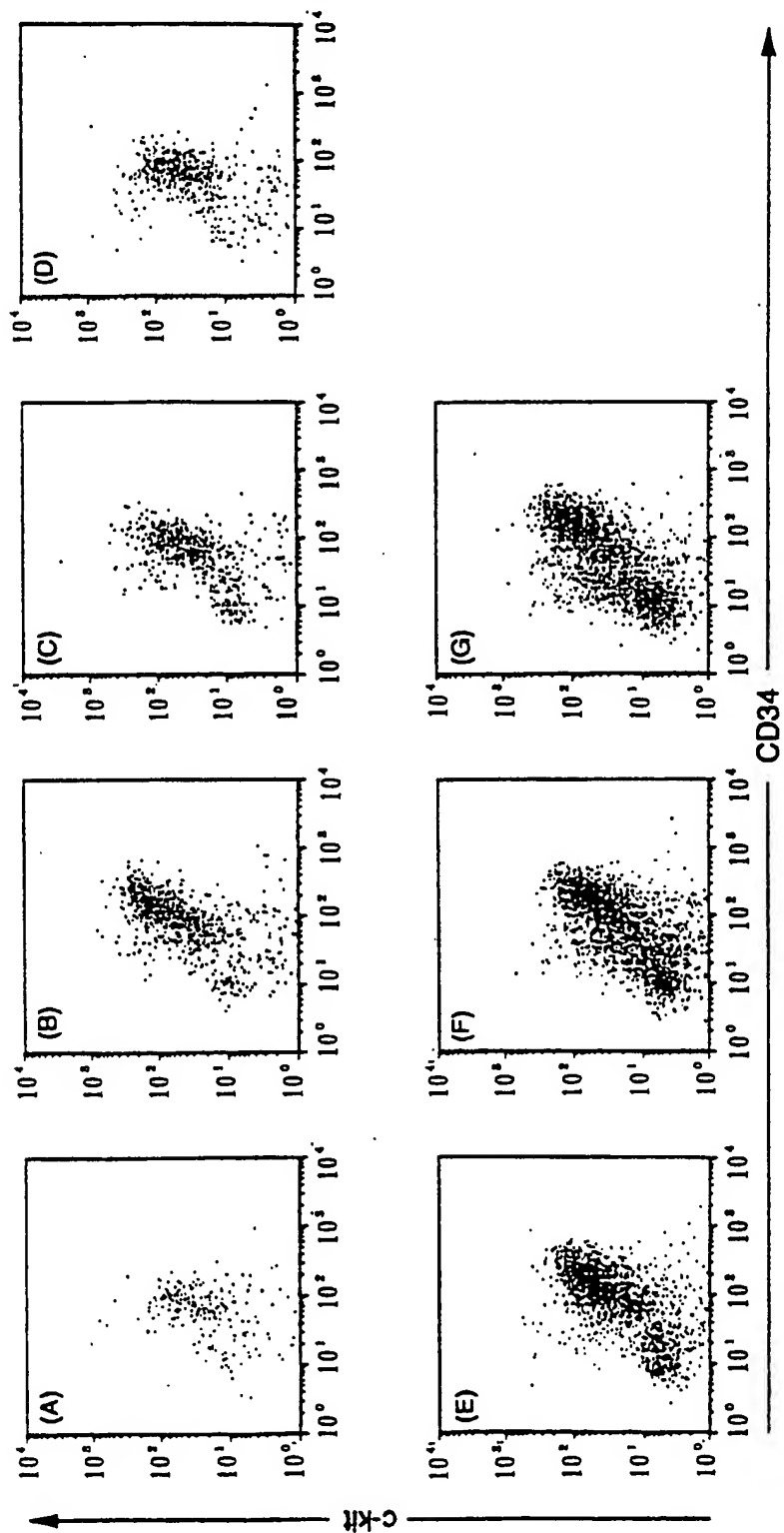
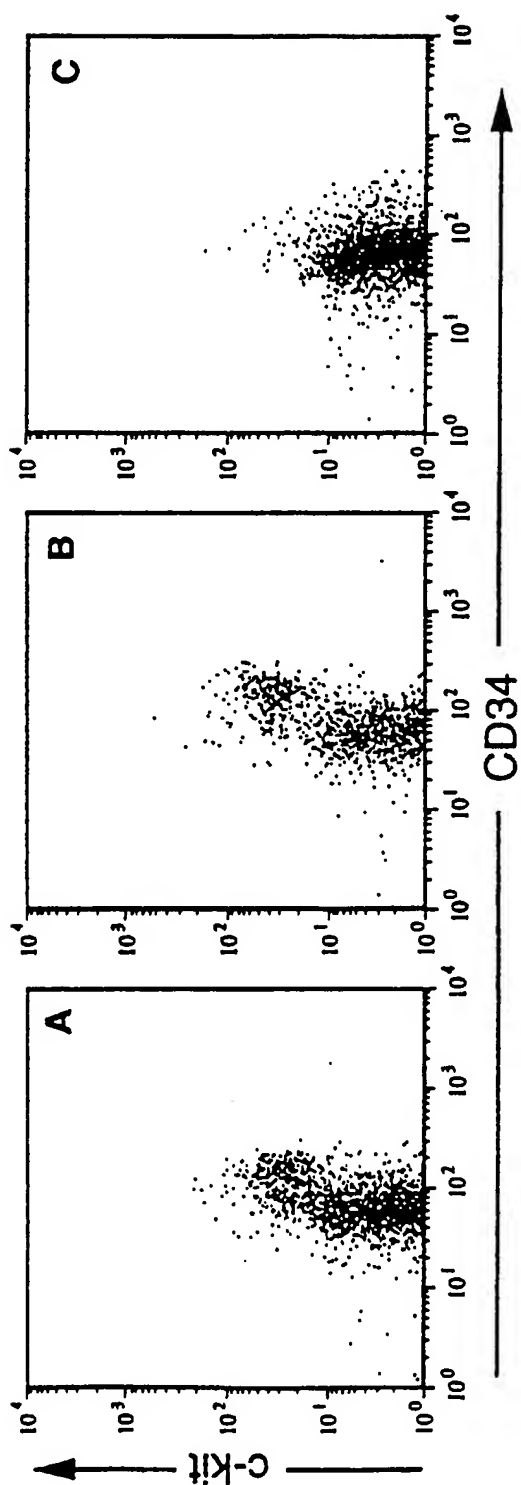


図 3



4 / 4

図 4



差替え用紙 (規則26)

Statement concerning non-perjudicial disclosure or exception to lack of novelty

The date of disclosure: 23 October 1996
The kind of the disclosure: Publication
The title of the conference The 26th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology

「不利にならない開示または発明の新規性喪失の例外に関する陳述」

開示の日 1996年10月23日
開示の方法 刊行物発表
刊行物の種類 第26回 日本免疫学会総会・学術集会
の要旨集 第118ページ 1P1-06
1996 The 26th Annual Meeting of The Japanese
Society for Immunology

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03797

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12N5/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12N5/00-5/28

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG) , BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, Y	SUGIYAMA H. et al., "ESTABLISHMENT OF A WGA+Sca-1 ⁻ c-kit ⁻ Thy-1 ⁻ Lin ⁻ HEMATOPOIETIC STEM CELL LINE AND ITS RESPONSE TO IL-6" Lymphokine and Cytokine Research, Vol. 12, No. 5 (1993) p. 325	10 - 12, 1 - 9
Y	JP, 6-508987, A (Indiana University Foundation), October 13, 1994 (13. 10. 94) & WO, 92/18615, A1 & EP, 584184, A1 & US, 5409825, A	1 - 9



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"B" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

January 29, 1998 (29. 01. 98)

Date of mailing of the international search report

February 10, 1998 (10. 02. 98)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ C12N 5/08

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ C12N 5/00~5/28

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X, Y	SUGIYAMA H. et al., "ESTABLISHMENT OF A WGA'Sca-1 ⁺ c-kitThy-1 ⁺ Lin ⁺ HEMATOPOIETIC STEM CELL LINE AND ITS RESPONSE TO IL-6" Lymphokine and Cytokine Research, Vol.12 No.5 (1993) p.325	10-12, 1-9
Y	JP, 6-508987, A (インディアナ・ユニバーシティ・フアンデーション) 13.10月.1994(13.10.94) & WO, 92/18615, A1 & EP, 584184, A1 & US, 5409825, A	1-9

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29.01.98

国際調査報告の発送日 10.02.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J.P)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

竹内 亜希

4B 9282

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.